

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

61 116 P1



(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND

DEUTSCHES
PATENTAMT**Offenlegungsschritt****(10) DE 43 05 225 A 1**

(51) Int. Cl. 5:

A61K 37/02
C07K 7/06**(71) Anmelder:**

Asta Medica AG, 01277 Dresden, DE

(72) Erfinder:Engel, Jürgen, Prof. Dr., 63755 Alzenau, DE;
Sauerbier, Dieter, 33824 Werther, DE; Wichert,
Burkhard, Dr., 33615 Bielefeld, DE; Reissmann,
Thomas, Dr., 60437 Frankfurt, DE**(64) Neues Herstellverfahren für Cetrorelix Lyophilisat****(65) Neues Lyophilisat und Herstellungsverfahren dazu sowie
Verwendung des Lyophilisats zur Herstellung von Arzneimitteln
zur Behandlung der weiblichen Infertilität und zur
Gnadenprotektion.**

DE 43 05 225 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 06.94 408 034/195

6/43

DE 43 05 225 A 1

DE 43 05 225 A1

Beschreibung

- Cetrorelix ist ein Dekapeptid mit einer endständigen Säureamidgruppe, das als Acetatsalz eingesetzt wird. Die Synthesen und einige pharmakologisch Wirkungen sind in der EP-Anmeldung 299 402 b schrieben. Der Wirkstoff soll subcutan in einer Dosis von 0,5 bis 2 mg appliziert werden können. Die wäßrigen Lösungen des Dekapeptids sind instabil, eine Autoklavierung im Endbehälter ist nicht möglich. Das Dekapeptid neigt unter diesen Bedingungen (120°C, 1,5 h) zur Zersetzung. Um eine injizierbare Lösung zu erhalten, war daher die Entwicklung eines Lyophilisats erforderlich. Allerdings ist die Menge des Wirkstoffes in der zu lyophilisierenden Lösung so gering, daß nur ein lockerer Plaum an der Glaswand der Ampulle nach der Trocknung der hilfsstofffreien Lösung resultiert, der mit dem zur Sterilisierung benutzten Wasserdampfstrom aus dem Vial ausgetragen wird. Es ist also erforderlich, einen Gerüstbildner einzusetzen, der einen stabilen Kuchen bildet. Als Gerüstbildner kommen folgende Hilfsstoffe in Frage: Hexite, insbesondere Mannit, Glucit, Sorbit, wie D-Sorbit, Dulcit, Allit, Altrit (zum Beispiel D- und L-Altrit), Idit (zum Beispiel D- und L-Idit), deren optisch aktive Formen (D- beziehungsweise L-Formen) sowie die entsprechenden Racemate. Insbesondere wird Mannit wie D-Mannit, L-Mannit, DL-Mannit, Sorbit und/oder Dulcit verwendet, und zwar hiervon vorzugsweise D-Mannit. Als Hexit können auch Mischungen der genannten Hexite verwendet werden, zum Beispiel Mischungen von Mannit und Sorbit und/oder Dulcit. Da Dulcit weniger wasserlöslich ist als beispielsweise Mannit, soll der Dulcithalt in der wäßrigen Lösung beispielsweise 3 Gewichtsprozent nicht überschreiten. Mannit und Sorbit hingegen können beispielsweise in allen Verhältnissen gemischt werden.
- Neben dem Hexit können auch noch andere, übliche pharmazeutische Hilfsstoffe zugeführt werden, wie zum Beispiel Glycin, Lactose, Polyvinylpyrrolidon, Glukose, Fructose, Albumin und äquivalente gerüstbildende Stoffe. Die Gesamtmenge an solchen Stoffen in der Lösung, die für die Gefriertrocknung eingesetzt wird, ist beispielsweise 0–16,9 Gewichtsteile, beispielsweise 0,1–7 Gewichtsteile, bezogen auf 1 Gewichtsteil Cetrorelix. In dem fertigen Lyophilisat kann die Gesamtmenge an solchen Hilfsstoffen bis zu 16,9 Gewichtsteile, bezogen auf einen Gewichtsteil Hexit, betragen. Im einzelnen richtet sich die Menge an solchen Hilfsstoffen nach der vorhandenen Menge Hexit und zwar derart, daß die Gesamtmenge an Hexit und solchen anderen Hilfsstoffen in dem fertigen Lyophilisat maximal nicht mehr als 17 Gewichtsteile beträgt, bezogen auf 1 Gewichtsteil Cetrorelix. Falls in dem Lyophilisat nur 0,1 Gewichtsteile Hexit vorliegen, können also bis zu 16,9 Gewichtsteile an anderen Hilfsstoffen vorliegen; falls beispielsweise 8,5 Gewichtsteile Hexit vorliegen, kann zum Beispiel die Menge an anderen Hilfsstoffen bis zu 8,5 Gewichtsteile, bezogen auf 1 Gewichtsteil Cetrorelix, betragen.
- Während der Entwicklungsarbeiten zu dem Lyophilisat mußte jedoch festgestellt werden, daß sich der Wirkstoff bei der Verarbeitung sehr unterschiedlich und nicht vorhersehbar verhält. Die ersten Ansätze führten zu guten Resultaten, bald jedoch stellte sich heraus, daß bei der Sterilfiltration Schwierigkeiten auftreten und Fehlchargen resultierten.
- Aus der Literatur ist bekannt, daß Oligopeptide, besonders solche mit endständiger Säureamidfunktionen zur Gelbildung neigen. Bei der Sterilfiltration ist dies an der Filtrationsgeschwindigkeit erkennbar, oft erkennt man sogar schon organoleptisch die erhöhte Viskosität derartiger Lösungen. Auf dem Sterilfilter bleibt eine gallertähnliche Schicht zurück. Damit ist es nicht mehr möglich, ein Arzneimittel mit einem genau definierten Gehalt an Wirkstoff herzustellen.
- In der Tabelle 1 sind verschiedene Ergebnisse der ersten 11 Ansätze aufgelistet. Die Wirkstoffgehalte schwanken zwischen 100% und 36%.

45

50

55

60

65

DE 43 05 225 A1

Tabelle 1

Cetrorelix-Acetat

Charge	Dosisierung	Wirkstoffgehalt	
	µg	g	
1	100	100	10
2	500	100	
3	500	90	
4	500	36	15
5	500	100	
6	500	85	
7	1 mg	80	20
8	1 mg	100	
9	2 mg	100	
10	2 mg	80	25
11	2 mg	100	

Um diese Gelbildung zu vermeiden, werden in der Literatur folgende Zusatzstoffe aufgeführt, die versuchsweise eingesetzt wurden:

Es kommen organische Lösungsmittel in Frage, beispielsweise Acetonitril, n-Butanol, tertiäres Butanol, Ethanol, Isopropanol, Octanol und Benzylalkohol. Weiter können Salze und Pufferlösungen verwendet werden, wie zum Beispiel Acetatpuffer, Citratpuffer, Natriumchlorid, Natriumphosphat, Natrium EDTA, Natriumbicarbonat, Phosphatpuffer, Guanidinacetat, Harnstoff.

Weitere Anwendung können Polymere finden, wie zum Beispiel Gelatine, Polyethylenglykol 600, Hydroxyethylstärke, Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohol. Auch der Zusatz von Aminosäuren, beispielsweise Alanin, Glycin, Lysin, Phenylalanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Leucin wurde schon beschrieben.

An Säuren wurde eingesetzt Citronensäure, Caprysäure, Octansäure, Salzsäure, Schwefelsäure und Essigsäure. An physiologisch unbedenklichen Tensiden stehen Benzalkoniumchlorid, Cetylalkohol, Gallensäuren, Lecithine, Polysorbate, Spans® und Pluronics® zur Verfügung.

Auch Kohlehydrate und Cyclodextrine wie zum Beispiel Glukose, Lactose, Mannitol, Saccharose, alpha-, beta- und gamma Cyclodextrine, Hydroxypropyl-alpha- und beta-Cyclodextrine, Hydroxyethyl Cyclodextrine und Methyl-Cyclodextrine wurden schon eingesetzt. Diese Hilfsstoffe wurden als Filtrationshilfsmittel zur Vermeidung der Gelbildung erprobt.

Eine befriedigende Lösung des Problems war jedoch nicht zu erkennen. Lediglich ein Ansäuern mit Essigsäure auf pH-Wert mit etwa 2,5 zeigte Teilerfolge. Aber auch hier mußten immer wieder höhere Filtrationsverluste hingenommen werden.

Überraschenderweise stellte sich nun heraus, daß man Cetrorelix in 30%iger Volumen/Volumen Essigsäure gut lösen kann. Diese Lösung wird anschließend auf eine Endkonzentration von 3% Cetrorelix mit Wasser für Injektionszwecke aufgefüllt und Mannit hinzugegeben. Obwohl in der Literatur beschrieben wird, daß in saurem Medium die endständige Amidgruppe leicht hydrolysiert, konnte dies beim Cetrorelix nicht festgestellt werden. Lösungen, die nach dieser Methode hergestellt werden, machen bei der Filtration keinerlei Schwierigkeiten. Es wurden immer die korrekten Wirkstoffgehalte gefunden.

Die Filtrationsgeschwindigkeit erreicht Werte, die befriedigende Produktionsabläufe sicherstellen. Ein allgemeiner Prozeß zur sterilen Lyophilisation wird in Sucker, Fuchs und Speiser (Herausgeber) "Pharmazeutische Technologie" 2. Auflage 1991, Thieme-Verlag, Stuttgart-New York, auf den Seiten 557 – 559 beschrieben. Eine weitere Beschreibung des angewandten Lyophilisierungsprozesses findet sich in der DE-OS 37 35 614.

Das Lyophilisat findet seine Anwendung in der Therapie der weiblichen Sterilität. Ein Therapieverfahren besteht bisher darin, durch humanes Menopausen-Gonadotropin die Follikelreifung zu stimulieren und danach durch Gabe von humanem Chorion Gonadotropin die Ovulation auszulösen. Die dadurch ausgelöste Ovulation erfolgte 32 Stunden später. Die dadurch gewonnenen Eizellen stehen für die extracorporeale Befruchtung zur Verfügung.

Ein Nachteil dieser Therapie mit Agonisten ist die Tatsache, daß in der Stimmulationsphase bis zu 10 Follikel heranreifen. Durch diese erhöhte Follikelreifung kommt es zu Hormonspiegelspitzen des LH. Diese Peaks haben ein Frühstadium der Follikelreifung zur Fuge und eine Ovulation zum nicht vorhergesehenen Zeitpunkt. Diese Ovulationsstörung tritt in ca. 25% der behandelten Fälle auf und stellt einen Nachteil dar, da der Zyklus, der eine

DE 43 05 225 A1

solche Ovulationsstörung liegt, für die Gewinnung von Eizellen verloren ist und für die ganze Behandlung ca. 1 Monat später wiederholt werden muß.

Ein weiterer Nachteil der konventionellen Stimmulationsbehandlung ist die lange Behandlungsdauer von 4 Wochen, die notwendig ist, um die befriedigende Suppression zu erreichen. Die Agonisten zeigen weiterhin in 5 1-2% der Fälle einen Hyperstimulationssyndrom, bei der die Follikelzellen hypertrophieren. Das Risiko der Hyperstimulation ist besonders groß bei polyzystischen Ovarien. Das Hyperstimulationssyndrom ist eine schwere Nebenwirkung, die zu Todesfällen führen kann.

Es hat sich nun herausgestellt, daß der Antagonist Cetrorelix gerade bei dieser Behandlung folgende Vorteile aufweist:

- 10 Um eine totale Suppression zu erreichen, genügen bei der Behandlung mit Cetrorelix eine Behandlungsdauer von 5 Tagen. Das Hyperstimulationssyndrom kann nicht auftreten. Darüber hinaus läßt sich in der 2. Therapiephase, der Ovulationsauslösephase, HMG einsparen. Dies stellt einen nicht unbeträchtlichen Kostenvorteil dieser in-vitro-Fertilisationsbehandlung dar. Die invitro-Fertilisation wird beispielsweise beim Vorliegen einer 15 Tubenanomalie eingesetzt. Für diese Therapie ist es notwendig, den Zyklus genau zu kontrollieren und den Zeitpunkt der Ovulation möglichst genau festzulegen. Bisher wurde dies nur eingeschränkt erreicht, da durch Stimulation mit HMG/HCG der präovulatorische LH-Anstieg oft zu früh auftrat oder nicht lange genug aufrechterhalten wurde. Es ist jedoch von entscheidender Bedeutung für den Behandlungserfolg, diesen verfrühten Anstieg zu verhindern, um den Befruchtungszeitpunkt genau festlegen zu können. Dadurch wird die körperliche und psychische Belastung der Patientinnen reduziert und die Kliniklogistik optimal eingesetzt. Um dieses Ziel mit hoher Zuverlässigkeit zu erreichen, ist es notwendig, die endogene Hormonproduktion (LH-FSH, Estradiol) möglichst vollständig zu supprimieren, um gleichzeitig durch die Gabe exogener Gonadotropine (HMG/HCG) die Follikelreifung zu stimulieren und den Hormonstatus jederzeit zu kontrollieren. Erst bei 20 Erreichen einer genügend hohen Anzahl von Follikeln (4-6), die etwa den gleichen Reifegrad besitzen, wird durch die Gabe einer HCG-Bolusinjektion die Ovulation ausgelöst.
- 25 Durch den Einsatz eines Antagonisten läßt sich die Behandlung wesentlich erfolgreicher und sicherer für die Patientinnen gestalten.

Ein weiteres Einsatzgebiet des Cetrorelix-Lyophilisats gemäß der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung bei der Gonadenprotection von männlichen Patienten. Die männlichen Patienten werden mit Cetrorelix-Lyophilisat vorbehandelt, und die Aktivität der Gonaden wird unterstützt. Dadurch haben andere schädigende Noxen, wie beispielsweise eine Strahlentherapie oder eine Cytostatika-Therapie keine oder nur noch geringe Möglichkeiten, auf das empfindliche Gonaden-Gewebe einzuwirken.

Beispiel für das Herstellverfahren

- 35 In ein geeignetes Glasgefäß werden ca. 1,5 Liter Wasser für Injektionszwecke vorgelegt. In ein weiteres Glasgefäß werden 210 g Wasser für Injektionszwecke vorgelegt und 91,17 g Essigsäure zugefügt. Die berechnete Menge Cetrorelixacetat (1,62 - 1,695 g, je nach Gehalt der eingesetzten Charge) wird in der hergestellte 30%igen Essigsäure unter Rühren gelöst. Diese Lösung wird in das Glasgefäß mit 1,5 Liter Wasser für Injektionszwecke überführt, 82,2 g Mannitol zugegeben, gelöst und mit Wasser für Injektionszwecke auf 3039 g aufgefüllt.
- 40 Inprozeßkontrollen:
pH-Wert: 2,5 - 3,0
Dichte: 1,009 - 1,017 g/cm³ bei 20°C
45 Brechungsindex: 1,227 - 1,340 bei 440 nm und 20°C

Die Sterilisationen der Lösung erfolgt durch Filtration über ein geeignetes Membranfilter (Porenweite 0,2 µm unter aseptischen Bedingungen) 100 ml Vorlauf sind zu verwerfen. Die Filter sind mit gespanntem Wasserdampf zu sterilisieren. Cetrorelix Gefriertrocknungslösung wird vor Rekontamination geschützt aufbewahrt.

- 50 50 Die Lösung wird unverzüglich in Injektionsflaschen DIN 2R farblos, hydrolytische Klasse I unter aseptischen Bedingungen dosiert und mit sterilen Gefriertrocknungsstopfen versehen. Die Sollfüllmenge beträgt 2,0 ml = 2,026 g.

Die 2 ml Injektionsflaschen wurden auf einer Injektionsflaschenwaschmaschine gespült und mit Heißluft getrocknet und sterilisiert. Die gereinigten Gefriertrocknungsstopfen wurden autoklaviert. Die vorverschlossenen Injektionsflaschen wurden in eine Gefriertrocknungsanlage überführt und bei einer Plattentemperatur von -40°C eingefroren. Die Trocknung erfolgt mittels eines Trocknungsprogramms bei einer Plattentemperatur von -40°C auf +20°C steigend. Anschließend wird die Anlage mit steriles Stickstoff geflutet, die Flaschen in der Anlage verschlossen, und die Stopfen mit Bördelklappen gesichert.

- 60 60 Die Injektionsflaschen werden visuell auf Verschlußfehler und äußere Fehler kontrolliert. Fehlerhafte Injektionsflaschen werden aussortiert und vernichtet.

Cetrorelix Lyophilisat 1 mg ist ein weißer, fester Gefriertrocknungskuchen in einer farblosen 2 ml Injektionsflasche, die mit grauen Gefriertrocknungsstopfen und gelber Flipp-off Bördelkappe verschlossen ist.

Patentansprüche

- 65 1. Lyophilisat aus Cetrorelix und mindestens einem Gerüststoff dadurch gekennzeichnet, daß man Ge- wichtsteil Cetrorelix in 100-300 Gewichtsteilen 30%iger (Gew/Gew.) Essigsäure auflöst und anschließend in Wasser überführt, dann 40-100 Teile Gerüststoff zugibt und die so erhaltene Lösung lyophilisiert.

DE 43 05 225 A1

2. Lyophilisat gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Gerüststoff Mannitol eingesetzt wird.
3. Verwendung des Lyophilisates, erhältlich nach Anspruch 1 oder 2 zur Therapie der weiblichen Infertilität.
4. Verwendung des Lyophilisats erhältlich nach Anspruch 1 oder 2 zur Gonadenprotektion.
5. Verwendung des Lyophilisats, erhältlich nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie der weiblichen Infertilität.
6. Verwendung des Lyophilisats, erhältlich nach Anspruch 1 oder 2, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Gonadenprotektion.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65